

瓜蒌皮提取物对大鼠血管内皮功能的影响

谭 斌^{1,3}, 刘思妤¹, 王桂霞², 曹喻灵¹, 彭 军^{3*}

(1. 湘南学院基础医学部药理教研室, 湖南 郴州 423000;

2. 湘南学院基础医学部机能实验室; 3. 中南大学药学院药理学系)

摘要: **目的** 研究瓜蒌皮提取物(EPT)对大鼠血管内皮功能损伤的影响,为下一步探明瓜蒌皮保护血管内皮的有效组份做准备。**方法** 用水煎醇沉法和萃取法提取瓜蒌皮的有效组份,用不同有效组份喂养低密度脂蛋白(LDL)损伤血管内皮大鼠,并检测血液内源性相关物质。**结果** 单次静注 LDL(4 mg/kg)显著诱导血管内皮细胞损伤,增加血浆中非对称二甲基精氨酸(ADMA)水平,而降低一氧化氮(NO)水平。两种提取(70%乙醇提取和氯仿萃取)的瓜蒌皮提取物均能显著抑制 LDL 所致 ADMA 浓度升高和 NO 的降低。**结论** 瓜蒌皮 70% 醇提取再氯仿萃取物能明显减轻血管内皮损伤,对血管有明显的保护作用。

关键词: 瓜蒌皮提取物; 血管内皮; 功能

中图分类号:R96 文献标识码:A

Effect of EPT Against Damages of the Endothelium Induced by Low-density Lipoprotein in Rats

TAN Bin, LIU Siyu, WANG Guixia, et al

(Department of Pharmacology, Xiangnan University, Chenzhou, Hunan 423000, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of extractive of pericarpium trichosanthis(EPT) on damages of the endothelium induced by low-density lipoprotein (LDL), and find out the effective components of pericarpium trichosanthis in protecting endo-thelial cells. **Methods** Extract the effective component of pericarpium trichosanthis with extraction method of water decoction alcohol and precipitation. Use different effective components to feed rats of the endothelium of damages induced by LDL, and detect endogenous related substance. **Results** A single injection of LDL (4 mg/kg) significantly increased the serum levels of asymmetric dimethylarginine (ADMA), reduced the serum levels of nitric oxide (NO). EPT with the different abstraction (70% alcohol and chloroform) markedly reduced the level of ADMA, and increased the level of NO. **Conclusion** EPT with the different abstraction (70% alcohol and chloroform) protects the endothelium against damages induced by LDL.

Key words: extractive of pericarpium trichosanthis; blood vessel endothelium; function

瓜蒌,原名栝楼实,为葫芦科植物栝楼(trichosanthis, fructus)或双边栝楼(Trichosanthes Rostkornii Harms)的干燥成熟果实。剖开果实,除去果瓢及种子称瓜蒌皮。皮、籽合用称瓜蒌。瓜蒌是一种常用中药^[1-2]。近年来的研究表明,瓜蒌有扩张冠

状动脉、保护心肌缺血等功效^[3]。为了探明瓜蒌治疗冠心病的有效成分,本研究团队用萃取法和水煎醇沉法^[4]从瓜蒌皮中分离提取出9个组份,并用不同有效组份喂养 LDL 损伤血管内皮大鼠,检测血液内源性相关物质变化反映提取物对大鼠主动脉血管内皮功能的影响。研究发现,瓜蒌皮提取物能明显改善血管内皮功能^[5]。血管内皮功能不全是动脉粥样硬化等心血管疾病的重要病理基础。临床研究证明,动脉粥样硬化等心血管疾病患者血中内源性二甲基精氨酸(ADMA)显著升高,并伴血管内皮舒张

收稿日期:2015-03-15;修回日期:2015-06-19

基金项目:湖南省高校创新平台开放基金(12K133);湖南省中医药管理局重点项目(201227);湖南省“十二五”重点建设学科基金(湘教发[2011]76号)。

* 通讯作者, E-mail: junpeng@csu.edu.cn.

功能障碍^[6]。因此可推测在瓜蒌提取物中凡能保护血管内皮功能的组分都将被认为是治疗冠心病的有效成分。因此,本文研究瓜蒌皮提取物对大鼠动脉血管内皮功能的影响,对筛选治疗冠心病中药的有效成分具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂 非对称性二甲基精氨酸(ADMA)标准品、苯肾上腺素和乙酰胆碱均购自 Sigma 公司;无水乙醇购自天津大茂化学试剂厂;一氧化氮(NO)试剂盒购自南京聚力生物公司。其它药物均市售分析纯。高效液相色谱(LC-6A, Japan);PcLab 生物信息采集系统(成都泰盟);低温离心机(JJ-6A, Beckman);722 分光光度计(上海分析仪器厂)。

1.2 瓜蒌皮分离提取方法

1.2.1 水煎醇沉法 将瓜蒌皮粉碎,水煎 3 次,合并滤液并蒸发成浸膏状,用 95% 乙醇沉淀,蒸干滤液,过大孔树脂,再用水和 40%、70%、95% 乙醇梯度洗脱后,除尽溶剂,配制成 3×10^{-4} g/mL 水溶液,备用。

1.2.2 萃取法 将瓜蒌皮粉碎,水煎 3 次,合并滤液并蒸发成浸膏状,用 95% 乙醇沉淀,蒸干滤液,过大孔树脂,再 70% 乙醇梯度洗脱后,除尽溶剂,分成三等份,分别用正丁醇、氯仿、乙酸乙酯萃取药液,并将有机溶剂蒸干除尽溶剂,配制成 3×10^{-5} g/mL 水溶液,备用。

1.3 实验动物及分组 SD 大鼠体重 200 ± 20 g,雌雄各半,购自中南大学动物学部。

1.3.1 动物分组(水煎醇沉法) 将 48 只 SD 大鼠随机分为 6 组,每组 8 只大鼠。

①空白对照组,用 0.9% 氯化钠注射液(4 mL/kg)每天灌胃 1 次,连续 5 天;

②LDL 损伤组,用 0.9% 氯化钠注射液(4 mL/kg)每天灌胃 1 次,连续 5 天,于第 4 天起,间隔 24 h 分别于尾缘静脉注射 LDL(4 mL/kg)以复制 LDL 大鼠模型;

③EPT(L)组:40% 乙醇瓜蒌皮提取物 + LDL 组,以浓度为 0.01 g/mL 40% 乙醇瓜蒌皮提取物每天灌胃 1 次,每次 4 mL/kg 连续 5 天,药物处理第 4 天起间隔 24 h 分别于尾缘静脉注射 LDL(4 mL/kg);

④EPT(M)组:70% 乙醇瓜蒌皮提取物 + LDL 组,以浓度为 0.01 g/mL 70% 乙醇瓜蒌皮提取物每天

灌胃 1 次,每次 4 mL/kg 连续 5 天,药物处理第 4 天起间隔 24 h 分别于尾缘静脉注射 LDL(4 mL/kg);

⑤EPT(H)组:95% 乙醇瓜蒌皮提取物 + LDL 组,以浓度为 0.01 g/mL 95% 乙醇瓜蒌皮提取物每天灌胃 1 次,每次 4 mL/kg 连续 5 天,药物处理第 4 天起间隔 24 h 分别于尾缘静脉注射 LDL(4 mL/kg);

⑥EPT(W)组:双蒸水瓜蒌皮提取物 + LDL 组,以浓度为 0.01 g/mL 双蒸水瓜蒌皮提取物每天灌胃 1 次,每次 4 mL/kg 连续 5 天,药物处理第 4 天起间隔 24 h 分别于尾缘静脉注射 LDL(4 mL/kg)。

1.3.2 实验动物分组(萃取法) 将 40 只 SD 大鼠随机分为 5 组,每组 8 只大鼠。

①空白对照组,用 0.9% 氯化钠注射液(4 mL/kg)每天灌胃 1 次,连续 5 天;

②LDL 损伤组,用 0.9% 氯化钠注射液(4 mL/kg)每天灌胃 1 次,连续 5 天,于第 4 天起,间隔 24 h 分别于尾缘静脉注射 LDL(4 mL/kg)以复制 LDL 大鼠模型;

③EPT(X)组:正丁醇瓜蒌皮提取物 + LDL 组,以浓度为 0.01 g/mL 正丁醇瓜蒌皮萃取物每天灌胃 1 次,每次 4 mL/kg 连续 5 天,药物处理第 4 天起间隔 24 h 分别于尾缘静脉注射 LDL(4 mL/kg);

④EPT(Y)组:氯仿瓜蒌皮提取物 + LDL 组,以浓度为 0.01 g/mL 氯仿瓜蒌皮萃取物每天灌胃 1 次,每次 4 mL/kg 连续 5 天,药物处理第 4 天起间隔 24 h 分别于尾缘静脉注射 LDL(4 mL/kg);

⑤EPT(Z)组:乙酸乙酯瓜蒌皮提取物 + LDL 组,以浓度为 0.01 g/mL 乙酸乙酯瓜蒌皮萃取物每天灌胃 1 次,每次 4 mL/kg 连续 5 天,药物处理第 4 天起间隔 24 h 分别于尾缘静脉注射 LDL(4 mL/kg)。

1.4 动物取血 将处理好的动物用 25% 乌来糖腹腔注射麻醉,固定在鼠板上,切开大鼠颈部皮肤,用玻璃分针慢慢分离一侧颈总动脉,用动脉夹夹住颈总动脉近心端,用线结扎近心端;用眼科剪小心的把动脉剪开一“V”型口,然后插入动脉导管,松开动脉夹,让血流进事先准备好的试管内,以 3 000 r/min 离心 20 min,分离得血清,取上清液倒入 EP 管内,置冰箱内冷冻待测。

1.5 血清内源性物质的检测

1.5.1 血清 ADMA 含量测定 用高效液相色谱(HPLC)测定血清中 ADMA 的含量(HPLC 系统:LC-10Advp;色谱柱:Nova-Pak C18)。取 10 μ L 血清样品或标准品加入 100 μ L 衍生试剂(为硼酸缓冲液

与邻苯二甲醛及 β -巯基乙醇等混合物),混匀,室温反应 3 min 然后进样,用线性梯度洗脱的方式将样品从色谱柱中洗脱[流动相 A 为 0.05 mol/L 乙酸钠:甲醇:四氢呋喃 = 82:17:1 (V/V/V),流动相 B 为 0.05mol/L 乙酸钠:甲醇:四氢呋喃 = 22:77:1 (V/V/V),流速为 1 mL/min],预柱处理后,用 RF-10Axl 型荧光检测器对 ADMA 进行检测(激发波长: λ = 338 nm;发射波长: λ = 425 nm)。

1.5.2 血清 NO 含量测定 生物系统中 NO 释放后很快转变成代谢产物 NO^{2-} 和 NO^{3-} ,以镉粉将 NO^{3-} 还原成 NO^{2-} , NO^{2-} 通过 Griess 重氮化反应生成有色化合物,用 722 分光光度计 540 nm 处测定,然后根据公式计算出 NO^{2-} 含量以此来反应血浆中 NO 浓度。

1.6 血管舒张实验 将处理好的动物模型用 25% 乌来糖腹腔麻醉开胸,颈动脉取血,迅速分离剪取胸主动脉段,置于充有 95% O_2 和 5% CO_2 混合气体的克—亨氏液 (NaCl 11.8, KCl 4.7, KH_2PO_4 1.2, MgSO_4 1.2, CaCl_2 2.5, NaHCO_3 25, Glucose 11 mmol/L)中(37 $^{\circ}\text{C}$)。剪去血管周围结缔组织并清除血管内血液,把血管剪成约 3~4 mm 的血管环,血管环一端固定于浴槽,另一端连接张力换能器,通过 Pclab 生物信息采集系统记录血管张力变化。实验过程中需更换克—亨氏液,调节静息张力为 2 g,待稳定后加入乙酰胆碱 (10^{-6} mol/L) 诱导血管环依赖性舒张。

1.7 统计分析 用 SPSS 软件进行统计学处理。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间差异采用方差分析。双侧 $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结 果

2.1 水煎醇沉法瓜蒌皮提取物对大鼠血浆内源性物质的影响 由表 1 可见,70% 乙醇瓜蒌皮提取物对大鼠血浆 ADMA、NO 的影响均较好,其次是水洗脱部分,也能有较好的效果。70% 乙醇提取物能对抗 LDL 对血管内皮的损害,升高血液中 NO 含量,降低 ADMA 血浆含量,表明此两部分提取物对血管内皮有明显的保护作用,说明对血管有保护作用的瓜蒌皮有效组份在 70% 乙醇提取物和水洗脱部分里。

2.2 水煎醇沉法瓜蒌皮提取物对大鼠血管舒张功能的影响 由图 1 可见,3 个不同浓度乙醇提取的瓜蒌皮中,70% 乙醇提取物喂养的大鼠血管的舒

张功能均较好,其次是水洗脱部分,也能有较好的效果。70% 乙醇提取物能对抗 LDL 对血管内皮的损害,其血管内皮舒张功能比较接近正常对照组,表明此两部分提取物对血管内皮有明显的保护作用,进一步说明对血管有保护作用的瓜蒌皮有效组份在 70% 乙醇提取物和水洗脱部分里。

表 1 水煎醇沉法瓜蒌皮提取物对大鼠血浆 ADMA、NO 的影响 ($n = 8$)

组别	ADMA ($\mu\text{mol/L}$)	NO ($\mu\text{mol/L}$)
Control 组	1.29 $\pm$ 0.19	48.86 $\pm$ 3.00
LDL 损伤组	1.63 $\pm$ 0.13 ^a	33.89 $\pm$ 6.02 ^a
EPT(L) 组	1.59 $\pm$ 0.16	34.06 $\pm$ 8.1
EPT(M) 组	1.32 $\pm$ 0.14 ^c	55.29 $\pm$ 5.54 ^c
EPT(H) 组	1.57 $\pm$ 0.17	34.07 $\pm$ 8.17
EPT(W) 组	1.38 $\pm$ 0.11 ^b	40.38 $\pm$ 5.95 ^b

与空白对照组比较, a: $P < 0.01$; 与 LDL 损伤组比较, b: $P < 0.05$, c: $P < 0.01$

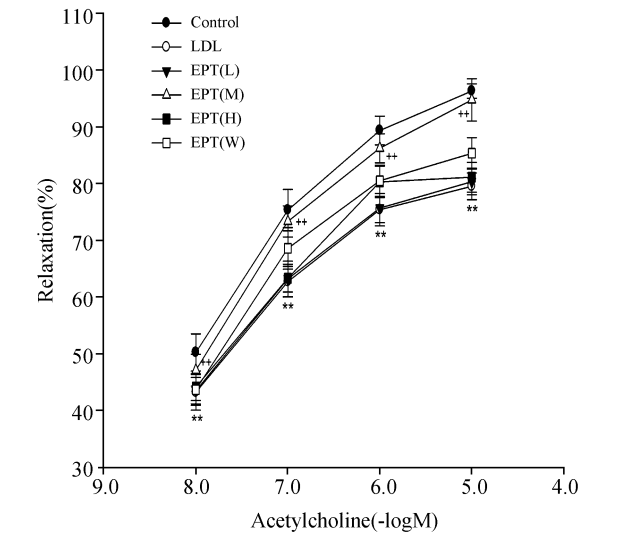


图 1 水煎醇沉法瓜蒌皮提取物对大鼠血管舒张功能的影响 与空白对照组比较, * *: $P < 0.01$; 与 LDL 损伤组比较, + : $P < 0.05$, ++ : $P < 0.01$

2.3 萃取法瓜蒌皮提取物对大鼠血浆内源性物质的影响 由表 2 可见,氯仿萃取物喂养的大鼠对其血浆 ADMA、NO 的影响最大。瓜蒌皮氯仿萃取物能对抗 LDL 对血管内皮的损害,升高血液中 NO 的含量,降低 ADMA 的血浆含量,表明此部分提取物对血管内皮舒张功能有明显的保护作用,说明对血管有保护作用的瓜蒌皮有效组份在氯仿萃取物里。

表 2 萃取法瓜蒌皮提取物各组份对大鼠血浆 ADMA、NO 的影响(n=8)

组别	ADMA(μmol/L)	NO (μmol/L)
Control 组	1.35 ± 0.21	49.36 ± 2.06
LDL 损伤组	1.71 ± 0.23 ^a	34.53 ± 3.43 ^a
EPT(X) 组	1.68 ± 0.17	34.74 ± 6.62
EPT(Y) 组	1.45 ± 0.15 ^b	55.46 ± 3.56 ^c
EPT(Z) 组	1.67 ± 0.23	34.47 ± 4.53

与空白对照组比较, a: $P < 0.01$; 与 LDL 损伤组比较, b: $P < 0.05$, c: $P < 0.01$

2.4 萃取法瓜蒌皮提取物对大鼠血管舒张功能的影响 由图 2 可见, 氯仿萃取物喂养的大鼠其血管的舒张功能最好。瓜蒌皮氯仿萃取物能对抗 LDL 对血管内皮的损害而血管内皮的舒张功能比较接近正常对照组, 表明此部分提取物对血管内皮舒张功能有明显的保护作用, 说明对血管有保护作用的瓜蒌皮有效组份在氯仿萃取物里。

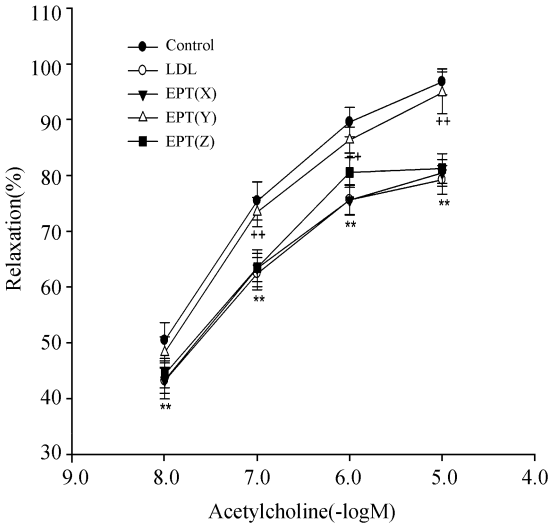


图 2 萃取法瓜蒌皮提取物对大鼠血管舒张功能的影响 与空白对照组比较, **: $P < 0.01$; 与 LDL 损伤组比较, +: $P < 0.05$, ++: $P < 0.01$

3 讨 论

NO 和 ADMA 是心血管的舒张和收缩密切相关的两种内源性活性物质, 在动脉粥样硬化的发病过程中起着重要的作用。NO 能够舒张血管, 而 ADMA 是血管内皮损伤的表现。LDL 过高可使血管内皮细

胞受损, 从而导致 NO 的释放更为减少, 进而又加重内皮功能的损伤, 同时 LDL 可诱导大鼠 ADMA 水平升高, 从而使血管发生动脉粥样硬化; 临床研究表明, 动脉粥样硬化等心血管疾病患者血中内源性 ADMA 显著升高, 并伴有血管内皮依赖性舒张功能减弱^[7], 这表明内源性 ADMA 含量升高是动脉粥样硬化等心血管疾病血管内皮功能不全发生的关键原因^[8]。本研究结果显示, 瓜蒌皮提取物能提高 LDL 诱导的大鼠血清 NO 水平, 降低 ADMA 水平, 具有保护血管内皮的作用。其机制可能是 EPT 通过降低 ADMA 水平, 提高内皮细胞对 NO 的生成与释放, 亦可能与 EPT 中的矿物质元素含量较高, 它们作为生物体内多种酶的辅酶, 对于核酸、蛋白质的合成有直接或间接的作用, 促进上皮细胞的修复有一定关系, 这一推断是否成立需要做进一步的研究, 并且已开始相关研究鉴定瓜蒌皮有效组份的化学成分。

综上所述, 瓜蒌皮用 70% 乙醇提取再用氯仿萃取的瓜蒌皮提取物具有明显的保护血管内皮作用。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.

[2] 屠婕红, 陈光伟. 瓜蒌的化学成分和药理作用研究概况[J]. 中国药师, 2004, 7(7): 562-563.

[3] 刘莉, 牛新萍. 瓜蒌皮注射液对稳定型心绞痛痰瘀互结证血管内皮功能的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2014, 3(1): 32-35.

[4] 王冬梅, 代世元. 瓜蒌皮提取物对大鼠动脉粥样硬化保护作用的实验研究[J]. 北华大学学报: 自然科学版, 2008, 9(2): 128-131.

[5] 黄荫浩, 吴翔, 陆齐, 等. 瓜蒌皮注射液对急性心肌梗死大鼠缺血心肌损伤的保护作用[J]. 海南医学, 2013, 8(24): 48-49.

[6] 谭斌, 罗苹灵, 陈伟利, 等. 瓜蒌皮提取物对糖尿病大鼠血管内皮的保护作用[J]. 中国心血管病研究杂志, 2009, 5(7): 549-551.

[7] Ito T, Azuma J. EPT is a possible anti-atherosclerotic agent[J]. Nippon Yakurigaku Zasshi, 2004, 123(5): 311-317.

[8] 陈昌喆, 段磊, 王贤, 等. 瓜蒌皮提取液对大鼠缺血心肌的保护作用[J]. 中国老年学杂志, 2014, 7(23): 39-42.

(此文编辑: 朱雯霞)